

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 5 月 10 日 (10.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/32921 A2

(51) 国際特許分類:  
33/53, 33/564, 33/566 // C12N 15/12

C12Q 1/68, G01N

(74) 代理人: 弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/07690

(22) 国際出願日: 2000 年 11 月 1 日 (01.11.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/310805 1999 年 11 月 1 日 (01.11.1999) JP

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 塩澤俊一 (SHIOZAWA, Shunichi) [JP/JP]; 〒651-2274 兵庫県神戸市西区竹の台2丁目11-6 Hyogo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小西良武 (KONISHI, Yoshitake) [JP/JP]; 〒654-0121 兵庫県神戸市須磨区妙法寺字ぬめり石 337-1A303 Hyogo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 第 17 条(2)(a)に基づく宣言: 要約なし; 国際調査機関により点検されていない発明の名称。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 01/32921 A2

(54) Title: METHOD OF DIAGNOSING RHEUMATOID ARTHRITIS

(54) 発明の名称: 慢性関節リウマチの診断方法

(57) Abstract:

## 明細書

### 慢性関節リウマチの診断方法

#### 5 技術分野

この出願の発明は、ヒト慢性関節リウマチの疾患遺伝子の診断方法に関するものである。

#### 背景技術

- 10 慢性関節リウマチの原因である関節炎と関節破壊の様相、特にそれらの病理過程は種々の研究を通じて次第に明らかになりつつあるが、この慢性関節リウマチの属する自己免疫疾患の多くは多数の原因因子が重なり合ってはじめて疾患へと発展・増悪するため、疾患の正しい解明と適切な治療を行うには、多因子相互作用の本体そのものが明らかにされなければならない。

15

- 慢性関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis : RA) は、世界的には罹患率 1 % 以下の疾患であるが (N.Engl.J. Med. 322:1277-1289, 1990)、患者の同胞では約 8 % 以上が発症する (Cell, 85:311-318, 1996) ことから、その原因因子として何らかの遺伝的要因が想定されている。しかしながら、疾患の遺伝的因子を特定するため通常用
- 20 いられている分子遺伝学的手法や遺伝子工学的手法は、自己免疫疾患に対しては有効に機能していない。何故ならば、自己免疫疾患は、癌のように突然変異を生じた 1 個の遺伝子の異常増殖という生物学的に単純な機構によって発症するものではないからである。また、疾患の遺伝的基盤を求める従来の古典的遺伝学的手法は、自己免疫疾患が多因子遺伝によることを明確にしたものの、その内部あるいは本体に
- 25 立ち入ることはできなかった。このように、慢性関節リウマチに関連する遺伝子については、その実体はもとより、染色体上の遺伝子座位すら全く捉えられていないのが実状であった。

これに対して、この出願の発明者等は、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を慢性間接リウマチ患者およびその血縁者に対して実施することにより、慢性関節リウマチの疾患遺伝子が位置する 3 カ所の遺伝子座を特定し (International Immunology 10(12):1891-1895, 1998; Journal of Clinical Rheumatology 4(3):156-158, 5 1998)、以下の疾患遺伝子を既に特許出願している (PCT/JP98/01665)。

- (1) ヒト第 1 染色体の、マイクロサテライトマーカー D1S214 および／または D1S253 がハイブリダイズする DNA 配列から ± 1 センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。
- (2) ヒト第 8 染色体の、マイクロサテライトマーカー D8S556 がハイブリダイズする 10 DNA 配列から ± 1 センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。
- (3) ヒト X 染色体の、マイクロサテライトマーカー DXS1001、DXS1047、DXS1205、DXS1227 および／または DXS1232 がハイブリダイズする DNA 配列から ± 1 センチモルガン以内に位置する慢性関節リウマチの疾患遺伝子。

15

この出願の発明者等は、前記先願発明の各疾患遺伝子についてさらに研究を続けた結果、前記(1)の疾患遺伝子に関係するマーカー D1S214 および D1S253 の GB4 Radiation hybrid map 上の物理的位置が、それぞれ 21.14 cR3000 および 23.56 cR3000 であること、そして、これらの近傍の 22.14 cR3000 に、デスレセプター 20 DR3 遺伝子 (Nature 384:372-375, 1996 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4615-4619, 1997 ; Genomics 49:385-393, 1998) が存在することを見出した。

この出願は、この出願の発明者等が見出した上記の知見に基づき、DR3 遺伝子を対象として慢性関節リウマチの発病を事前に高精度に診断することのできる方法を 25 提供することを課題としている。

#### 発明の開示

この出願は、前記の課題を解決する発明として、ヒトゲノム DNA を制限酵素

EcoR I で断片化し、配列番号 1 の位置 159-424 の塩基配列を有するプローブとハイブリダイズする約 7 kb の DNA 断片を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法を提供する。

- 5      またこの出願は、ヒトゲノム DNA を制限酵素 Dra I で断片化し、配列番号 1 の位置 159-424 の塩基配列を有するプローブとハイブリダイズする約 1.5 kb の DNA 断片を検出することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法を提供する。

- 10      さらにこの出願は、末梢血単核球を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) および／または phytohemagglutinin (PHA) で刺激し、配列番号 1 の少なくとも位置 689-760 の塩基配列から発現される mRNA 量と、同様に PMA および／または PHA 刺激した健常者の末梢血単核球における同一 mRNA の発現量とを比較することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法を提供する。

- 15      またさらに、この出願は、末梢血単核球を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) および／または phytohemagglutinin (PHA) で刺激し、配列番号 1 の少なくとも位置 201-224 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの発現量と、同様に PMA および／または PHA 刺激した健常者の末梢血単核球における同一ポリペプチドの発現量とを比較することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法をも提供する。

20

なお、前記の診断方法においては、健常者に比べて RA 患者の当該 mRNA またはポリペプチドの発現量が多いこと（具体的には、2 倍以上）が診断の判定基準となる。

- 25      図面の簡単な説明

図 1 は、RA 患者と健常者のそれぞれのゲノム DNA の EcoR I 断片に対するサザン解析の結果である。

図 2 は、RA 患者と健常者のそれぞれのゲノム DNA の Dra I 断片に

対するサザン解析の結果である。

図 3 は、RA 患者と健常者のそれぞれにおける DR3 遺伝子の細胞膜貫通領域およびデストメイン領域の mRNA 発現量の定量結果である。

## 5 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を示して、この発明の最良の実施形態について詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例によって限定されるものではない。

### 実施例 1 : EcoR I 断片の RFLP 分析

- 10 ゲノム DNA はグアニジンチオシアネート法（日本輸血学会雑誌, 40(2):413, 1994）により健常者および RA 患者の末梢血から調製した。すなわち、EDTA 採血した末梢血（10 ml）に 20 ml の細胞膜溶解液（I 液：0.32 M sucrose, 1% v/v Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM Tris-HCl pH7.6）を加え、転倒混和後 3000rpm で 10 分間遠心し、核を回収した。回収した核に 5 ml の核膜溶解液（II 液：4 M guanidine thiocyanate, 15 12 mM EDTA, 375 mM NaCl, 0.5% N-lauroyl sarcosinate, 0.1 M  $\beta$ -mercaptoethanol, 12 mM Tris-HCl pH7.6）を加え、55°C で 10 分間保温し、エタノール沈殿によりゲノム DNA を調製した。

- このゲノム DNA 10  $\mu$ g に EcoR I（宝酒造社）75 unit、10xH 緩衝液（宝酒造社）20  $\mu$ l を加え、滅菌水で全量を 200  $\mu$ l に調整した。この反応液を 37°C で 18 時間保温  
20 することによりゲノム DNA を消化して EcoR I 断片化した。次いで、反応液にフェノール 100  $\mu$ l、クロロホルム 100  $\mu$ l を加えて混和後、12000rpm で 10 分間遠心し、上清を回収し、常法のエタノール沈殿法により断片化した DNA を回収した。得られた DNA 断片を分子量マーカー  $\lambda$  / HindIII（ニッポンジーン社）と共に 0.7% AgaroseL（ニッポンジーン社）ゲルにて 50V、約 2 時間 TAE 緩衝液中で電気泳動し  
25 た。ゲルを変性溶液（0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl）に 25 分間浸し、さらに中和溶液（0.5 M Tris-HCl pH7.5, 1.5 M NaCl）に 30 分間浸した。常法のキャピラリー法により、ゲル内の DNA をナイロンメンブレン（Hybond-N+, Amersham Pharmacia 社）に一晩トランスファーし、UV クロスリンカー（日本ジェネティック社）により DNA

をメンブレンに固定した。キャピラリーの緩衝液には 10 x SSC を用いた。

ハイブリダイゼーションおよび DNA 断片の検出は、Gene Images<sup>TM</sup>ラベリング・検出システム (Amersham Pharmacia 社) を用いて以下のとおりに行った。DNA を固定したメンブレンをハイブリダイゼーション緩衝液 [5xSSC, 0.1% w/v SDS, 5% w/v デキストラン硫酸 分子量 50 万 (Sigma 社), 5% v/v ブロッキング試薬 (キット付属)] に浸し、60°C で 30 分間振とうさせながらプレハイブリダイゼーションを行った。

健常者の末梢血単核球から調製した total RNA より公知の RT-PCR により DR3 cDNA を調製し、この cDNA から配列番号 1 の位置 159-424 の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを調製し、フルオレセイン標識してプローブとした。95°C で 5 分間加熱することにより熱変性させたプローブを 10 ng/ml となるようにプレハイブリダイゼーション溶液に加え、さらに振とうさせながら 60°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。予め 60°C に加熱した緩衝液 (1xSSC, 0.1% w/v SDS) で 15 分間洗浄し、同様にして緩衝液 (0.1xSSC, 0.1% w/v SDS) で 15 分間洗浄した。メンブレンを緩衝液 A (100 mM Tris-HCl pH9.5, 300 mM NaCl) で軽くリンスし、緩衝液 A で 10 倍希釈したブロッキング試薬 (キット付属) を用いて室温 1 時間ブロッキングした。メンブレンを緩衝液 A で軽くリンスし、抗体希釈溶液 [アルカリフォスファターゼ標識抗フルオレセイン抗体 (キット付属) を 0.5% w/v BSA を含んだ緩衝液 A で 5000 倍希釈した溶液] に浸し、室温で 1 時間インキュベートした。0.3% v/v Tween20 含有緩衝液 A で 10 分間、3 回の洗浄を室温で振とうさせながら行った。メンブレンを緩衝液 A で軽くリンスし、検出試薬 (キット付属) に浸した後、X 線フィルム (フジフィルム社) に露光させた。

結果は図 1 に示したとおりである。健常者では約 9kb の DNA 断片の存在を示すバンドのみが検出されたのに対し、RA 患者では約 9kb DNA 断片に加え、約 7kb の DNA 断片の存在を示すバンド (多型バンド) が検出された。

以上の結果から、ゲノム DNA を EcoR I 断片化し、プローブとハイブリダイズする約 7kb DNA 断片の存在を確認することによって、RA 患者の診断が可能であることが確認された。

## 実施例 2 : Dra I 断片の RFLP 分析

制限酵素 Dra I (宝酒造社) および 10xM 緩衝液 (宝酒造社) を用いたこと以外は実施例 1 と同様にして分析した。

- 5      結果は図 2 に示したとおりである。健常者では 10kb 以上のバンドが検出されたのに対し、RA 患者ではこの 10kb 以上のバンドに加え、約 1.5kb の DNA 断片の存在を示す多型バンドが検出された。

以上の結果から、ゲノム DNA を Dra I 断片化し、プローブとハイブリダイズする約 1.5kb DNA 断片の存在を確認することによって、RA 患者の診断が可能であること  
10      とが確認された。

## 実施例 3 : DR3 mRNA の定量

健常者 6 人および RA 患者 7 人のそれぞれからヘパリン採血した末梢血 10 ml を等量のリン酸緩衝液 (PBS) と混和し、これを 20 ml の Lymphoprer (第一化学薬品  
15      社) に重層した。1500rpm で 30 分間遠心後、末梢血単核球 (PBMC) の層を採取し、PBS で洗浄した後、培地 (RPMI 1640/10%FCS) に懸濁。5 × 10<sup>5</sup> cells/ml に懸濁した細胞懸濁液 10 ml を 10 cm dish に播き、PMA (Sigma 社) 20 ng/ml および PHA (Difco Laboratories 社) 1 μg/ml で刺激し、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で 48 時間培養した。細胞を回収し、PBS で洗浄後、Isogen (ニッポンジーン社) を用いて total RNA  
20      を調製した。

この total RNA を対象として、パーキンエルマー (PE) 社のキット (TaqMan Cold RT-PCR Reagents) を用いて定量 RT-PCR を行った。100 ng の total RNA をキット付属の試薬を用い、25°C ; 10 分間、48°C ; 30 分間、95°C ; 5 分間のプログラムにより逆転写した。この溶液の 1/100 を鋳型として、各種プライマー、プローブ  
25      およびキット付属の試薬を規定量加え、PCR 反応を行い、発現量を ABI PRISM 7700 (PE 社) により測定した。PCR は、(50°C ; 2 分間) 1 サイクル、(95°C ; 10 分間) 1 サイクルの後、(熱変性 95°C ; 15 秒間、アニーリング・伸長反応 60°C ; 1 分間) 40 サイクルの条件で行った。DR3 の定量は、細胞膜貫通領域 (配列

番号 1 の位置 689-760 の塩基配列) を含む DR3 遺伝子 cDNA から発現される mRNA と、デスドメイン領域 (配列番号 1 の位置 1091-1330 の塩基配列) を含む DR3 遺伝子 cDNA から発現される mRNA を対象とした。なお、使用したプローブおよび PCR プライマーは以下のとおりである。

5      細胞膜貫通領域

プローブ: 配列番号 1 の位置 691-710 の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (5'側に 6-carboxy-fluorescein、3'側に 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine を結合)

10      センスプライマー: 配列番号 1 の位置 468-485 の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチド

アンチセンスプライマー: 配列番号 1 の位置 743-762 の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチド

デスドメイン領域

15      プローブ: 配列番号 1 の位置 1154-1173 の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (5'側に 6-carboxy-fluorescein、3'側に 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine を結合)

センスプライマー: 配列番号 1 の位置 912-932 の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチド

20      アンチセンスプライマー: 配列番号 1 の位置 1209-1232 の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチド

また、内部標準として rRNA の定量を同時に行い、補正を行った。この rRNA 定量に用いたプローブは配列番号 2 の塩基配列からなるオリゴヌクレオチド (5'側に 2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxy-fluorescein、3'側に 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine を結合) である。また、rRNA 定量の PCR プライマーは配列番号 3 (セ  
25      ンスプライマー) および配列番号 4 (アンチセンスプライマー) の各々の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドである。

DR3 および rRNA 定量のための検量線は、DR3 および rRNA の cDNA をそれぞれクローニングしたプラスミドを鋳型にして作成した。いずれも同一サンプルを 3 回



測定した。DR3 mRNA の発現量は、同時に測定した rRNA の値で割った補正值で示した。

結果は図 3 に示したとおりである。DR3 mRNA の発現量は、デスドメイン領域では RA 患者： $0.90 \pm 0.26$ （平均 $\pm$ SE）、健常者： $0.92 \pm 0.43$  であり、両者の発現量  
5 に有意な差はみられなかったのに対し、細胞膜貫通領域では、RA 患者： $1.84 \pm 0.27$ 、健常者： $0.82 \pm 0.25$  であり、RA 患者において DR3 mRNA の有意な発現増加が観察された。

以上の結果から、末梢血単核球を PMA および PHA で刺激し、配列番号 1 の位置 689-760 の塩基配列から発現される mRNA、またはこの mRNA から転写されるポリ  
10 リペプチド（配列番号 1 の位置 201-224 のアミノ酸配列を有するポリペプチド）の発現量を測定し、この発現量が健常者のそのの少なくとも 2 以上であるか否かを測定することによって、RA 患者の診断が可能であることが確認された。

#### 産業上の利用可能性

15 以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、慢性関節リウマチの診断を簡便かつ確実に行うことが可能となる。このような診断は、慢性関節リウマチの新たな治療法および治療薬剤の開発にも有用である。

## 請求の範囲

1. ヒトゲノム DNA を制限酵素 EcoR I で断片化し、配列番号 1 の位置 159-424 の塩基配列を有するプローブとハイブリダイズする約 7kb の DNA 断片を検出すること  
5 とを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法。
2. ヒトゲノム DNA を制限酵素 Dra I で断片化し、配列番号 1 の位置 159-424 の塩基配列を有するプローブとハイブリダイズする約 1.5kb の DNA 断片を検出すること  
10 を特徴とする慢性関節リウマチの診断方法。
3. 末梢血単核球を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) および／または phytohemagglutinin (PHA) で刺激し、配列番号 1 の少なくとも位置 689-760 の塩基配列から発現される mRNA 量と、同様に PMA および／または PHA 刺激した健常者の末梢血単核球における同一 mRNA の発現量とを比較することを特徴とする慢性  
15 関節リウマチの診断方法。
4. 末梢血単核球を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) および／または phytohemagglutinin (PHA) で刺激し、配列番号 1 の少なくとも位置 201-224 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの発現量と、同様に PMA および／または PHA 刺  
20 激した健常者の末梢血単核球における同一ポリペプチドの発現量とを比較することを特徴とする慢性関節リウマチの診断方法。

图 1

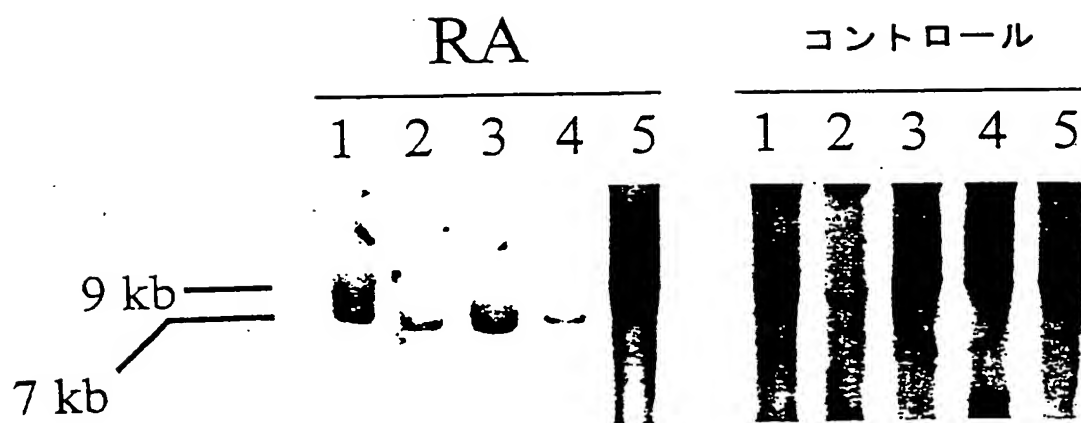


図 2

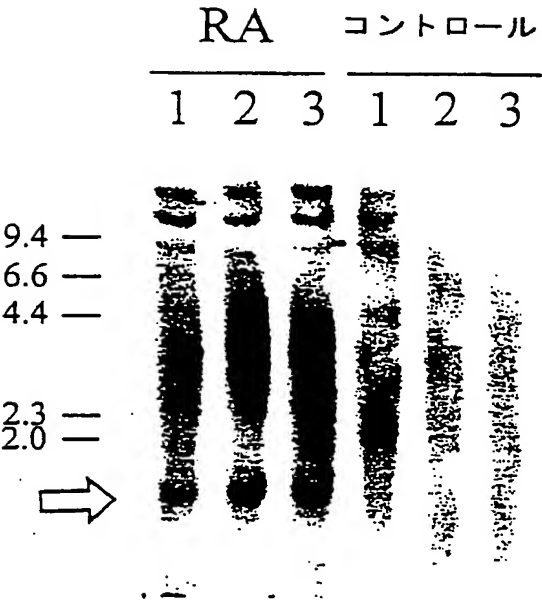
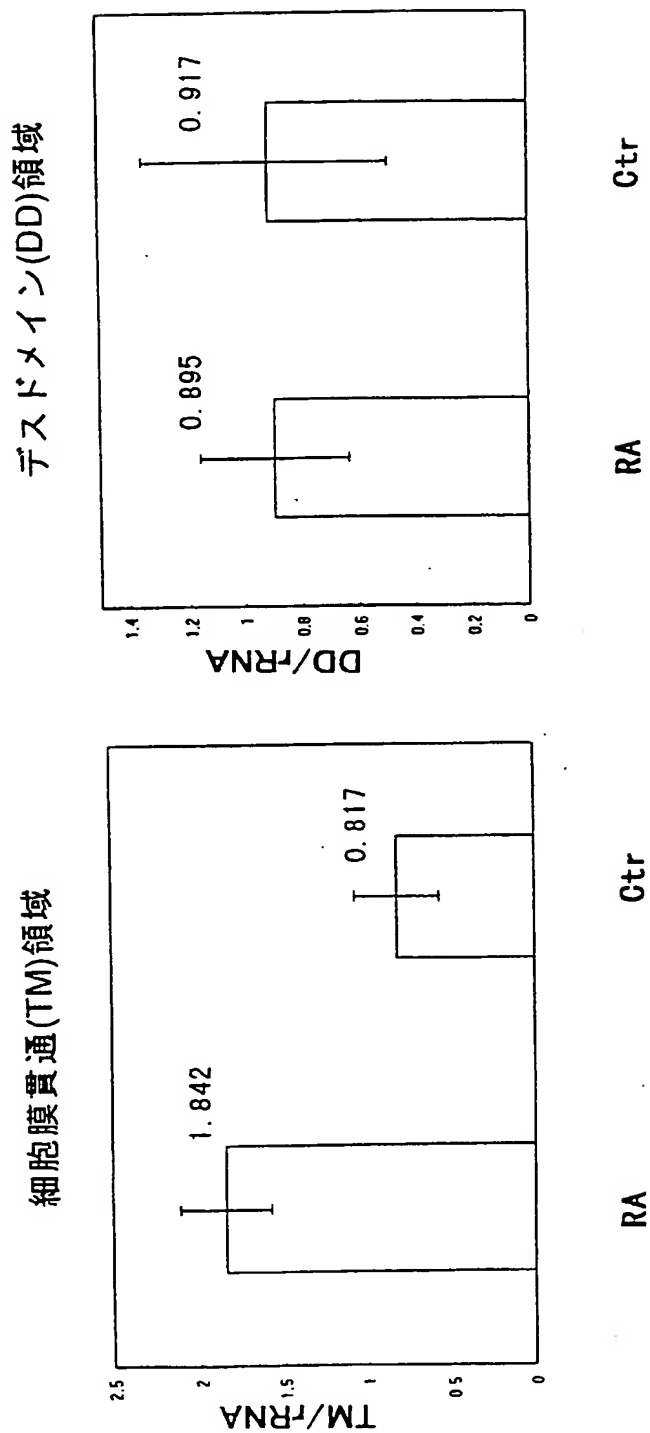


図 3

# DR3 mRNA の定量 (平均 ± 標準誤差)



## SEQUENCE LISTING

<110> Shiozawa, shunnich

<120> A Method for Diagnosing Rheumatoid Arthritis

5

<130> NP99453-YS

<140>

<141>

10

<150> JP11-310805

<151> 1999-11-01

<160> 4

15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1634

20 &lt;212&gt; DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

25 &lt;222&gt; (89).. (1342)

<400> 1

cgggccctgc gggcgcgggg ctgaaggcgg aaccacgacg ggcagagagc acggagccgg 60

gaagccctg ggcgcccgtc ggagggct atg gag cag cgg ccg cgg ggc tgc 112  
 Met Glu Gln Arg Pro Arg Gly Cys  
 1 5  
 gcg gcg gtg gcg gcg gcg ctc ctc ctg gtg ctg ctg ggg gcc cgg gcc 160  
 5 Ala Ala Val Ala Ala Ala Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Ala Arg Ala  
 10 15 20  
 cag ggc ggc act cgt agc ccc agg tgt gac tgt gcc ggt gac ttc cac 208  
 Gln Gly Gly Thr Arg Ser Pro Arg Cys Asp Cys Ala Gly Asp Phe His  
 25 30 35 40  
 10 aag aag att ggt ctg ttt tgt tgc aga ggc tgc cca gcg ggg cac tac 256  
 Lys Lys Ile Gly Leu Phe Cys Cys Arg Gly Cys Pro Ala Gly His Tyr  
 45 50 55  
 ctg aag gcc cct tgc acg gag ccc tgc ggc aac tcc acc tgc ctt gtg 304  
 Leu Lys Ala Pro Cys Thr Glu Pro Cys Gly Asn Ser Thr Cys Leu Val  
 15 60 65 70  
 tgt ccc caa gac acc ttc ttg gcc tgg gag aac cac cat aat tct gaa 352  
 Cys Pro Gln Asp Thr Phe Leu Ala Trp Glu Asn His His Asn Ser Glu  
 75 80 85  
 tgt gcc cgc tgc cag gcc tgt gat gag cag gcc tcc cag gtg gcg ctg 400  
 20 Cys Ala Arg Cys Gln Ala Cys Asp Glu Gln Ala Ser Gln Val Ala Leu  
 90 95 100  
 gag aac tgt tca gca gtg gcc gac acc cgc tgt ggc tgt aag cca ggc 448  
 Glu Asn Cys Ser Ala Val Ala Asp Thr Arg Cys Gly Cys Lys Pro Gly  
 105 110 115 120  
 25 tgg ttt gtg gag tgc cag gtc agc caa tgt gtc agc agt tca ccc ttc 496  
 Trp Phe Val Glu Cys Gln Val Ser Gln Cys Val Ser Ser Ser Pro Phe  
 125 130 135  
 tac tgc caa cca tgc cta gac tgc ggg gcc ctg cac cgc cac acg cgg 544

Tyr Cys Gln Pro Cys Leu Asp Cys Gly Ala Leu His Arg His Thr Arg  
 140 145 150  
 cta ctc tgt tcc cgc aga gat act gac tgt ggg acc tgc ctg cct ggc 592  
 Leu Leu Cys Ser Arg Arg Asp Thr Asp Cys Gly Thr Cys Leu Pro Gly  
 5 155 160 165  
 ttc tat gaa cat ggc gat ggc tgc gtg tcc tgc ccc acg agc acc ctg 640  
 Phe Tyr Glu His Gly Asp Gly Cys Val Ser Cys Pro Thr Ser Thr Leu  
 170 175 180  
 ggg agc tgt cca gag cgc tgt gcc gct gtc tgt ggc tgg agg cag atg 688  
 10 Gly Ser Cys Pro Glu Arg Cys Ala Ala Val Cys Gly Trp Arg Gln Met  
 185 190 195 200  
 ttc tgg gtc cag gtg ctc ctg gct ggc ctt gtg gtc ccc ctc ctg ctt 736  
 Phe Trp Val Gln Val Leu Leu Ala Gly Leu Val Val Pro Leu Leu Leu  
 205 210 215  
 15 ggg gcc acc ctg acc tac aca tac cgc cac tgc tgg cct cac aag ccc 784  
 Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Thr Tyr Arg His Cys Trp Pro His Lys Pro  
 220 225 230  
 ctg gtt act gca gat gaa gct ggg atg gag gct ctg acc cca cca ccg 832  
 Leu Val Thr Ala Asp Glu Ala Gly Met Glu Ala Leu Thr Pro Pro Pro  
 20 235 240 245  
 gcc acc cat ctg tca ccc ttg gac agc gcc cac acc ctt cta gca cct 880  
 Ala Thr His Leu Ser Pro Leu Asp Ser Ala His Thr Leu Leu Ala Pro  
 250 255 260  
 cct gac agc agt gag aag atc tgc acc gtc cag ttg gtg ggt aac agc 928  
 25 Pro Asp Ser Ser Glu Lys Ile Cys Thr Val Gln Leu Val Gly Asn Ser  
 265 270 275 280  
 tgg acc cct ggc tac ccc gag acc cag gag gcg ctc tgc ccg cag gtg 976  
 Trp Thr Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Gln Glu Ala Leu Cys Pro Gln Val



	285	290	295	
	aca tgg tcc tgg gac cag ttg ccc agc aga gct ctt ggc ccc gct gct	1024		
	Thr Trp Ser Trp Asp Gln Leu Pro Ser Arg Ala Leu Gly Pro Ala Ala			
	300	305	310	
5	gcg ccc aca ctc tcg cca gag tcc cca gcc ggc tcg cca gcc atg atg	1072		
	Ala Pro Thr Leu Ser Pro Glu Ser Pro Ala Gly Ser Pro Ala Met Met			
	315	320	325	
	ctg cag ccg ggc ccg cag ctc tac gac gtg atg gac gcg gtc cca gcg	1120		
	Leu Gln Pro Gly Pro Gln Leu Tyr Asp Val Met Asp Ala Val Pro Ala			
10	330	335	340	
	ogg cgc tgg aag gag ttc gtg cgc acg ctg ggg ctg cgc gag gca gag	1168		
	Arg Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Thr Leu Gly Leu Arg Glu Ala Glu			
	345	350	355	360
	atc gaa gcc gtg gag gtg gag atc ggc cgc ttc cga gac cag cag tac	1216		
15	Ile Glu Ala Val Glu Val Glu Ile Gly Arg Phe Arg Asp Gln Gln Tyr			
	365	370	375	
	gag atg ctc aag cgc tgg cgc cag cag cag ccc gcg ggc ctc gga gcc	1264		
	Glu Met Leu Lys Arg Trp Arg Gln Gln Gln Pro Ala Gly Leu Gly Ala			
	380	385	390	
20	gtt tac gcg gcc ctg gag cgc atg ggg ctg gac ggc tgc gtg gaa gac	1312		
	Val Tyr Ala Ala Leu Glu Arg Met Gly Leu Asp Gly Cys Val Glu Asp			
	395	400	405	
	ttg cgc agc cgc ctg cag cgc ggc ccg tga cacggcgccc acttgccacc	1362		
	Leu Arg Ser Arg Leu Gln Arg Gly Pro			
25	410	415		
	taggcgctct ggtggccctt gcagaagccc taagtacggt tacttatgcg tgtagacatt	1422		
	ttatgtcaact tattaagccg ctggcacggc cctgcgtagc agcaccagcc ggccccaccc	1482		
	ctgctcgccc ctatcgctcc agccaaggcg aagaagcacg aacgaatgtc gagaggggggt	1542		

5.

gaagacattt ctcaacttct cggccggagt ttggctgaga tcgcggtatt aaatctgtga 1602  
aagaaaacaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1634

5 &lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; synthesized oligonucleotide

&lt;400&gt; 2

tgctggcacc agacttgccc tc

22

15 &lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;

20 &lt;223&gt; synthesized oligonucleotide

&lt;400&gt; 3

cggctaccac atccaaggaa

20

25

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial sequence

<220> 18

<223> synthesized oligonucleotide

5 <400> 4

gctggaatta ccgcggct

18

# PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

### DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT (PCT Article 17(2)(a), Rules 13ter.1(c) and 39)

Applicant's or agent's file reference 00-F-057PCT	<b>IMPORTANT DECLARATION</b>	Date of mailing ( <i>day/month/year</i> ) 26 December, 2000 (26.12.00)
International application No. PCT/JP00/07690	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 01 November, 2000 (01.11.00)	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 01 November, 1999 (01.11.99)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC Int.CI7 C12Q 1/68, G01N 33/53, G01N 33/564, G01N 33/566 // C12N 15/12		
Applicant Shunichi SHIOZAWA		

This International Searching Authority hereby declares, according to Article 17(2)(a), that no international search report will be established on the international application for the reasons indicated below.

1. ☐ The subject matter of the international application relates to:
  - a. ☐ scientific theories.
  - b. ☐ mathematical theories.
  - c. ☐ plant varieties.
  - d. ☐ animal varieties.
  - e. ☐ essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes.
  - f. ☐ schemes, rules or methods of doing business.
  - g. ☐ schemes, rules or methods of performing purely mental acts.
  - h. ☐ schemes, rules or methods of playing games.
  - i. ☐ methods for treatment of the human body by surgery or therapy.
  - j. ☐ methods for treatment of the animal body by surgery or therapy.
  - k. ☒ diagnostic methods practised on the human or animal body.
  - l. ☐ mere presentations of information.
  - m. ☐ computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art.
  
2. ☐ The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out:
 

☐ the description
☐ the claims
☐ the drawings
  
3. ☐ The failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions prevents a meaningful search from being carried out:
 

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
   
☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.
  
4. Further comments:

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

特 許 協 力 条 約

PCT

国際調査報告を作成しない旨の決定

(法第8条第2項、法施行規則第42条、第50条の3第  
[PCT17条(2)(a)、PCT規則13の3.1(c)、39]

出願人又は代理人 の書類記号 00-F-057PCT	重要決定	発送日 (日.月.年) 26.12.00
国際出願番号 PCT/JP00/07690	国際出願日 (日.月.年) 01.11.00	優先日 (日.月.年) 01.11.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl' C12Q 1/68, G01N 33/53, G01N 33/564, G01N 33/566 // C12N 15/12		
出願人 (氏名又は名称) 塩澤 俊一		

この出願については、法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定に基づき、次の理由により国際調査報告を作成しない旨の決定をする。

1. ☐ この国際出願は、次の事項を内容としている。
  - a. ☐ 科学の理論
  - b. ☐ 数学の理論
  - c. ☐ 植物の品種
  - d. ☐ 動物の品種
  - e. ☐ 植物及び動物の生産の本質的に生物学的な方法 (微生物学的方法による生産物及び微生物学的方法を除く。)
  - f. ☐ 事業活動に関する計画、法則又は方法
  - g. ☐ 純粹に精神的な行為の遂行に関する計画、法則又は方法
  - h. ☐ 遊戯に関する計画、法則又は方法
  - i. ☐ 人の身体の手術又は治療による処置方法
  - j. ☐ 動物の身体の手術又は治療による処置方法
  - k. ☒ 人又は動物の身体の診断方法
  - l. ☐ 情報の単なる提示
  - m. ☐ この国際調査機関が先行技術を調査できないコンピューター・プログラム
2. ☐ この国際出願の次の部分が所定の要件を満たしていないので、有効な国際調査をすることができない。
 

☐ 明細書
 ☐ 請求の範囲
 ☐ 図面
3. ☐ ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C (塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン) に定める基準を満たしていないので、有効な国際調査をすることができない。
 

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。
 ☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。
4. 附記

名称及びあて名 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	9281
-----------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------	----	------